

(51) Classification internationale des brevets ⁵ :

C12N 15/51, A61K 31/70
C12N 9/00

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 93/05157

(43) Date de publication internationale:

18 mars 1993 (18.03.93)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00840

(22) Date de dépôt international: 3 septembre 1992 (03.09.92)

(30) Données relatives à la priorité:

91/10872 3 septembre 1991 (03.09.91) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GENSET [FR/FR]; 1, passage Etienne-Delaunay, F-75011 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BLUMENFELD, Marta [FR/FR]; 75, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR). THILL, Gilbert [FR/FR]; 24, rue Victor-Hugo, F-92270 Bois-Colombes (FR). VASSEUR, Marc [FR/FR]; 25, boulevard Arago, F-75013 Paris (FR).

(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: RIBOSOMAL STRUCTURE DERIVED FROM THE GENOMIC RNA STRUCTURE OF THE DELTA HEPATITIS VIRUS

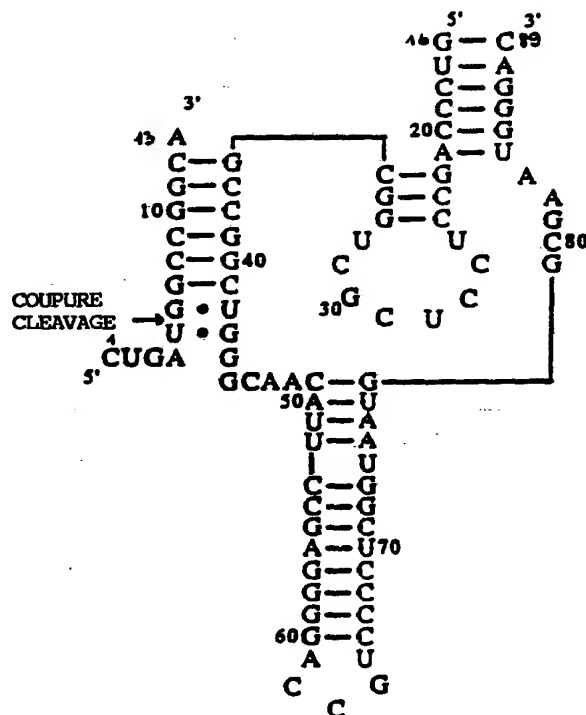
(54) Titre: STRUCTURE RIBOZYMIQUE DERIVEE DE L'ARN GENOMIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE DELTA

(57) Abstract

The present invention concerns a ribosomal structure derived from genomic RNA of the delta hepatitis virus consisting in one or more fragments of said genomic RNA of the delta hepatitis virus, capable of having a catalytic trans cleavage activity on another molecule containing a given RNA nucleic acid sequence.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une structure ribozymique dérivée de l'ARN génomique du virus de l'hépatite delta consistant dans un ou plusieurs fragments dudit ARN génomique du virus de l'hépatite delta, et capable d'exercer une activité catalytique de coupure en trans sur une autre molécule comportant une séquence spécifique d'acide nucléique d'ARN.



FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FI	Finland	MN	Mongolia
AU	Australia	FR	France	MR	Mauritania
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgium	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norway
BG	Bulgaria	GR	Greece	NZ	New Zealand
BJ	Benin	HU	Hungary	PL	Poland
BR	Brazil	IE	Ireland	PT	Portugal
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	RU	Russian Federation
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovak Republic
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	SU	Soviet Union
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TD	Chad
DE	Germany	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Denmark	ML	Mali	UA	Ukraine
ES	Spain			US	United States of America

STRUCTURE RIBOZYMIQUE DERIVEE DE L'ARN GENOMIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE DELTA

La présente invention concerne une nouvelle structure ribozymique pouvant couper en trans une molécule cible d'ADN ou d'ARN.

Précisément, cette nouvelle structure ribozymique est une molécule d'ARN dérivée de l'ARN génomique du virus humain de l'hépatite delta.

L'ARN génomique du virus humain de l'hépatite delta présente des activités autocatalytiques. A partir de fragments d'ARN de taille réduite conservant une activité autocatalytique de coupure, dérivés de l'ARN viral génomique, on a réussi selon l'invention à séparer de façon distincte une partie catalytique et une partie substrat, comme il sera explicité ci-après.

Dès lors, une coupure peut être obtenue au cours d'une réaction binaire en mélangeant la structure ribozymique ayant l'activité catalytique avec un ARN ou ADN substrat hétérologue. Cette caractérisation d'un fragment à activité catalytique de coupure permet, selon l'invention, d'utiliser ces structures ribozymiques de l'ARN génomique du virus de l'hépatite delta comme structure ribozymique du type "humain" pour le clivage d'ARN cibles, in vitro ou in vivo, à des fins expérimentales, thérapeutiques ou prophylactiques.

Les ribozymes sont des molécules d'ARN qui sont naturellement capables d'exercer des activités catalytiques, et particulièrement des activités RNAsiques. On a cherché, à partir de tels ribozymes naturels, à déterminer des structures ribozymiques artificielles capables d'exercer des coupures enzymatiques sur des ARN cibles spécifiques.

De tels ribozymes fournissent donc des outils thérapeutiques pouvant être utilisés dans le cadre d'approches de type oligonucléotides "antisens", notamment pour dégrader spécifiquement des ARN cibles de type pathogènes.

Les activités ribozymiques semblent largement répandues, et l'on a décrit des ARN catalytiques chez les bactéries, les protozoaires, les plantes, et les systèmes animaux. Les premières activités ribozymiques ont été mises en évidence tout d'abord dans les systèmes d'épissage des introns de classe I, puis dans la RNase P. Plus récemment, on a découvert que les génomes de nombreux virus à ARN, de plantes ou même de mammifères

portaient également des activités ribozymiques qui intervenaient au cours du cycle de multiplication virale. Enfin, certains ARN transcrits à partir de régions d'ADN satellite chez le triton présentent également une activité ribozymique naturelle, servant à couper les transcrits concatémériques.

5 L'analyse de la structure des ribozymes génomiques de certains virus de plantes a mis en évidence des séquences réactionnelles communes ainsi que des structures secondaires consensus qui ont permis de construire des ribozymes pouvant agir sur mesure comme agents de clivage de séquences spécifiques d'ARN. L'analyse des régions impliquées dans ces
10 coupures a fait apparaître une structure commune dite en "tête de marteau", ou en "T", nécessaire et suffisante pour effectuer la réaction nucléasique.

Une seconde classe de ribozymes, dérivés également d'un virus de plante présente une structure catalytique en "épingle à cheveux", ou
15 structure en "L".

Ces différents types de ribozyme fonctionnent in vitro, mais les efficacités de coupure in vivo, dans des cellules animales ou humaines, sont encore peu efficaces. Cette inefficacité relative est vraisemblablement due, au moins en partie, au fait que toutes ces ribozymes sont dérivées de
20 virus végétaux et non de virus animaux ou même humains.

Le virus de l'hépatite delta est un virus humain à ARN, que l'on trouve systématiquement associé au virus de l'hépatite B. L'ARN génomique, et également l'ARN anti-génomique de ce virus présentent tous deux une activité de clivage autocatalytique. La séquence du fragment
25 d'ARN de longueur minimale présentant une activité ribozymique n'offre aucune ressemblance avec les motifs catalytiques déjà connus de type "T" ou "L". Le virus de l'hépatite delta se réplique dans les hépatocytes humains et son activité ribozymique fonctionne parfaitement dans ces cellules. Son activité ribozymique a été naturellement sélectionnée pour
30 fonctionner dans des cellules humaines de foie et on dispose donc avec ce modèle d'un exemple parfait de ce que pourrait être un ribozyme actif chez l'homme.

L'ARN génomique du virus de l'hépatite delta, long de 1700 nucléotides, comporte en effet une région capable d'exercer une coupure autocatalytique. Cette coupure autocatalytique peut être effectuée par un sous-fragment d'une longueur de 89 nucléotides dont la structure
5 secondaire peut se schématiser sous la forme représentée à la figure 1.

Cette structure longue de 89 nucléotides comporte une conformation de type "pseudo-noeud". La coupure autocatalytique s'effectue au niveau de la liaison phosphodiester indiquée par la flèche sur la figure 1.

10 A partir de ce fragment ribozymique à activité autocatalytique on a, selon la présente invention, fourni des structures ribozymiques comportant une activité catalytique pouvant s'exercer en trans, au cours d'une réaction binaire, sur une seconde molécule d'ARN cible. Cette invention fournit de nouvelles molécules ribozymiques pouvant cliver
15 efficacement des molécules d'ADN ou d'ARN cible, notamment de nature pathologique, à des fins thérapeutiques ou prophylactiques, dans des cellules humaines, animales ou même végétales.

Il s'agit là d'une nouvelle activité ribozymique en trans. La molécule responsable de cette coupure en trans présente une structure et
20 une séquence ne correspondant à aucune autre structure ribozymique agissant en trans précédemment décrite.

En utilisant les techniques de synthèse chimique de l'ARN, des sous-fragments d'ARN correspondant à différentes régions de la molécule, représentée figure 1, ont été préparés. Ces différents fragments ont ensuite
25 été testés dans des expériences de reconstructions afin de différencier les fragments substrats des fragments catalytiques.

La présente invention a donc pour objet une structure ribozymique dérivée de l'ARN génomique du virus de l'hépatite delta consistant dans un ou plusieurs fragments dudit ARN génomique du virus de
30 l'hépatite delta, et capable d'exercer une activité catalytique de coupure en trans sur une autre molécule comportant une séquence spécifique d'acide nucléique ARN.

Par "autre molécule", on entend selon la présente demande que la coupure s'exerce sur une molécule autre que l'ARN génomique du
35 virus de l'hépatite delta.

Dans un mode de réalisation particulièrement approprié la structure ribozymique est constituée de un ou deux fragment(s) issu(s) de la séquence de 74 nucléotides comportant les nucléotides de 16 à 89 représentés sur la figure 2.

5 Parmi les structures testées, les structures ribozymiques préférées, c'est-à-dire les plus efficaces en termes d'activité de coupure, comportent un seul fragment.

En particulier, la structure ribozymique selon l'invention peut
consister dans le fragment de 74 nucléotides comportant les nucléotides de
10 16 à 89 ou ce même fragment 16-89 dans lequel une partie seulement des nucléotides 50 à 77 ont été délétés. Lorsque la totalité de la séquence 50-77 a été délétée, le fragment perd de son activité catalytique de coupure.

De préférence, la structure ribozymique selon l'invention
15 comportera une séquence d'au moins 12 nucléotides.

Selon l'invention, ladite séquence d'acide nucléique de ladite autre molécule correspond à un fragment de l'ARN génomique du virus de l'hépatite delta substrat de ladite activité catalytique de coupure en trans.

En particulier, ladite séquence d'acide nucléique de ladite
20 autre molécule substrat de l'activité catalytique pourra comporter la séquence 5'XGGCC3' avec X = C ou U, ladite structure ribozymique étant capable d'exercer l'activité nucléasique ou ribonucléasique sur la liaison phosphodiester entre X et G.

Dans un mode de réalisation, ladite séquence d'acides
25 nucléiques de ladite autre molécule pourra comporter le fragment de 8 nucléotides allant des nucléotides 5 à 12 représentés sur la figure 2.

De façon appropriée, l'activité catalytique de coupure a lieu en présence d'ions métalliques divalents, notamment le magnésium.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la structure
30 ribozymique selon l'invention est insérée dans ladite autre molécule et est capable d'exercer une activité autocatalytique de clivage sur cette autre molécule dans laquelle elle est insérée.

Comme on l'a vu, la structure ribozymique selon l'invention exercera une activité ribonucléasique, notamment endoribonucléasique sur une autre molécule comportant un polyribonucléotide de séquence spécifique.

La structure ribozymique selon l'invention peut être utilisée à des fins thérapeutiques ou prophylactiques dans des cellules procaryotes ou eucaryotes, animales ou végétales, ladite autre molécule pouvant donc être une molécule hétérologue de cellules animales ou végétales.

On pourra utiliser la particule virale de l'hépatite delta comme système d'encapsulation ou tout autre vecteur pour la délivrance intra-cellulaire de structures ribozymiques selon l'invention, que ce soit dans des bactéries, des cellules eucaryotes, animales ou végétales.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre. Cette description est faite en référence aux figures 1 à 4.

- La figure 1 représente la structure secondaire potentielle en "pseudo-noeud" d'un fragment autocatalytique de l'ARN génomique du virus de l'hépatite delta.

- La figure 2 représente la structure potentielle du complexe binaire de coupure en trans par un ribozyme dérivé du brin génomique du virus de l'hépatite delta.

- La figure 3 représente l'autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 20 % sur lequel on a fait migrer les produits des incubations d'une structure ribozymique selon l'invention avec son substrat, après des temps variables.

- La figure 4 représente une analyse sur gel de polyacrylamide 10 %/7 M urée des produits d'une cinétique de coupure autocatalytique d'une structure ribozymique de 71 nucléotides de long comportant une délétion dans la structure auto-appariée 50-77.

Exemple 1

Parmi les combinaisons testées on a découvert, comme on l'a vu, qu'il était possible d'effectuer une coupure en trans en utilisant comme substrat un fragment composé, par exemple, de 13 nucléotides (1 à 13) de

la figure 2 et en utilisant comme structure ribozymique une molécule composée soit de deux fragments, comportant respectivement les nucléotides de 16 à 62 et 63 à 89, soit d'un seul fragment de 74 nucléotides de long comportant les nucléotides de 16 à 89.

5 Ce ribozyme de 74 nucléotides a été obtenu par transcription in vitro par la RNA polymérase T7 d'une matrice d'ADN bicaténaire. Cette matrice a été obtenue en synthétisant chimiquement les séquences d'ADN, en les hybridant, puis en amplifiant le produit obtenu par une réaction de PCR. Cette réaction de PCR permet, en utilisant les amorces appropriées,
10 d'ajouter les séquences de promotions de la transcription permettant le fonctionnement de la polymérase T7.

La figure 2 illustre la structure ribozymique de 74 nucléotides et de son substrat de 13 nucléotides.

15 Ce ribozyme long de 74 nucléotides est capable d'effectuer une coupure rapide du substrat. Si l'on incube le ribozyme en présence du substrat pendant des temps variables de 0 à 60 minutes, dans un tampon contenant 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris pH 8,0 2 mM spermidine, on observe (figure 3) qu'une coupure a lieu. La figure 3 représente l'autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 20 % sur lequel on a fait migrer les produits des
20 incubations du ribozyme avec son substrat après des temps variables. Le substrat a été marqué en 5' par du gamma-ATP ^{32}P par la T4 polynucléotide kinase et purifié sur gel de polyacrylamide avant utilisation. On observe qu'une partie importante de ce substrat est clivée dès les premières minutes de l'incubation, clivage matérialisé par une bande marquée longue
25 de 5 nucléotides qui apparaît rapidement dans les conditions de fonctionnement ribozymique, c'est-à-dire en présence de magnésium. Les témoins effectués en présence d'EDTA sont négatifs, ce qui montre que l'on observe bien une réaction enzymatique dépendant de la présence de magnésium (ou d'autres ions divalents) ce qui est une caractéristique des ribozymes.

30 Exemple 2

Les résultats expérimentaux ci-après montrent que la présence de la structure secondaire appariée située entre les nucléotides 50 et 77 n'est en partie pas indispensable à l'activité catalytique de ce ribozyme.

En partant de la structure d'un ribozyme de 89 nucléotides de long comme celui décrit dans la figure 1, on procède à des expériences de délétion de certaines régions, et en particulier des délétions de la structure en épingle à cheveux ("hairpin") comprise entre les nucléotides 50 et 77. En effet, cette "hairpin" est une structure secondaire extrêmement stable, que l'on retrouve dans toutes les configurations potentielles calculées par des programmes de minimalisation d'énergie appliqués à l'analyse de la structure de ce ribozyme et est probablement effectivement présente dans la structure active.

Afin de déterminer si cette structure secondaire appariée jouait un rôle catalytique ou bien structural, on a délété les nucléotides 53 à 61 et 66 à 74. Ces délétions ont été effectuées en synthétisant un fragment d'ADN comportant la séquence désirée, puis en amplifiant ce fragment par PCR comme décrit précédemment pour le ribozyme de 74 nucléotides. Après amplification avec les amorces appropriées et transcription par l'ARN polymérase de T7, on obtient une structure ribozymique longue de 71 nucléotides conservant son activité autocatalytique et fonctionnant à 37°C et à 60°C (figure 4).

Le ribozyme a été marqué en 5' par du gamma-ATP ^{32}P par la T4 polynucléotide kinase et purifié sur gel de polyacrylamide avant utilisation. On le dénature à 95°C pendant 1 minute en présence de 1 mM EDTA, puis il est refroidi rapidement à 0°C sur glace (snap-cool). Le milieu de réaction est ensuite ajusté en ajoutant 40 mM Tris pH 8,0 et 10 mM MgCl_2 , puis incubé à 37°C (2 à 7) ou à 60°C (8 à 13). Des fractions aliquotes sont prélevées à des temps variables : 1 minute (2 & 8), 2 minutes (3 & 9), 5 minutes (4 à 10), 10 minutes (5 & 11), 20 minutes (6 & 12), et 60 minutes (7 & 13). Dans le contrôle (1), la réaction a été arrêtée au temps t 0 minute avant addition de 10 mM MgCl_2 .

Le ribozyme natif (89 nucléotides de long) coupe son ARN avec un $t_{1/2}$ de 15 secondes, alors que le ribozyme délété présente un $t_{1/2}$ de 3 minutes. Donc, la délétion modifie la structure générale du ribozyme, ce qui modifie la cinétique de la réaction, mais elle n'affecte pas directement le site catalytique.

Il est donc possible de réduire la taille de la structure ribozymique fonctionnelle de la figure 2 en réduisant partiellement la longueur de cette boucle 50-77.

LEGENDES RELATIVES A LA FIGURE 3 :

- T1** = Substrat seul incubé dans le milieu de réaction pendant 60'
- T2** = Substrat incubé dans le milieu de réaction en présence du ribozyme H Δ V et de 10 mM EDTA
- C** = Cinétique de coupure = substrat incubé en présence du ribozyme H Δ V
- M** = Marqueur de taille indiquant la position de la bande coupée attendue (5nt)

REVENDICATIONS

1) Structure ribozymique dérivée de l'ARN génomique du virus de l'hépatite delta consistant dans un ou plusieurs fragments dudit ARN génomique du virus de l'hépatite delta, et capable d'exercer une activité catalytique de coupure en trans sur une autre molécule comportant une séquence spécifique d'acide nucléique d'ARN.

2) Structure ribozymique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un ou deux fragment(s) issu(s) de la séquence de 74 nucléotides comportant les nucléotides de 16 à 89 représentés sur la figure 2.

3) Structure ribozymique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle consiste dans le fragment de 74 nucléotides comportant les nucléotides de 16 à 89 représentés sur la figure 2.

4) Structure ribozymique selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle consiste dans un fragment issu du fragment de 74 nucléotides constitué des nucléotides 16 à 89 de la figure 2, fragment dans lequel une partie des nucléotides 50 à 77 ont été délétés.

5) Structure ribozymique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence d'au moins 12 nucléotides.

6) Structure ribozymique selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite séquence d'acides nucléiques de ladite autre molécule correspond à un fragment de l'ARN génomique du virus de l'hépatite delta substrat de ladite activité catalytique de coupure en trans.

7) Structure ribozymique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est capable d'exercer une activité catalytique de coupure sur la liaison phosphodiester entre X et G avec X = C ou U d'une séquence d'acide nucléique ARN respectivement comportant la séquence 5'XGGCC3'.

8) Structure ribozymique selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce qu'elle est capable d'exercer une activité catalytique de coupure sur une séquence d'acides nucléiques de ladite autre molécule comportant le fragment de 8 nucléotides allant des nucléotides 5 à 12 représentés sur la figure 2.

9) Structure ribozymique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est insérée dans ladite autre molécule et est capable d'exercer une activité autocatalytique de clivage sur cette autre molécule dans laquelle elle est insérée.

5

10) Structure ribozymique selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle est capable d'exercer une activité ribonucléasique, notamment endoribonucléasique, sur une autre molécule comportant un polyribonucléotide.

10

11) Structure ribozymique selon l'une des revendications 1 à 10 utile pour la mise en oeuvre d'une méthode de traitement thérapeutique ou prophylactique dans des cellules procaryotes ou eucaryotes, animales ou végétales.

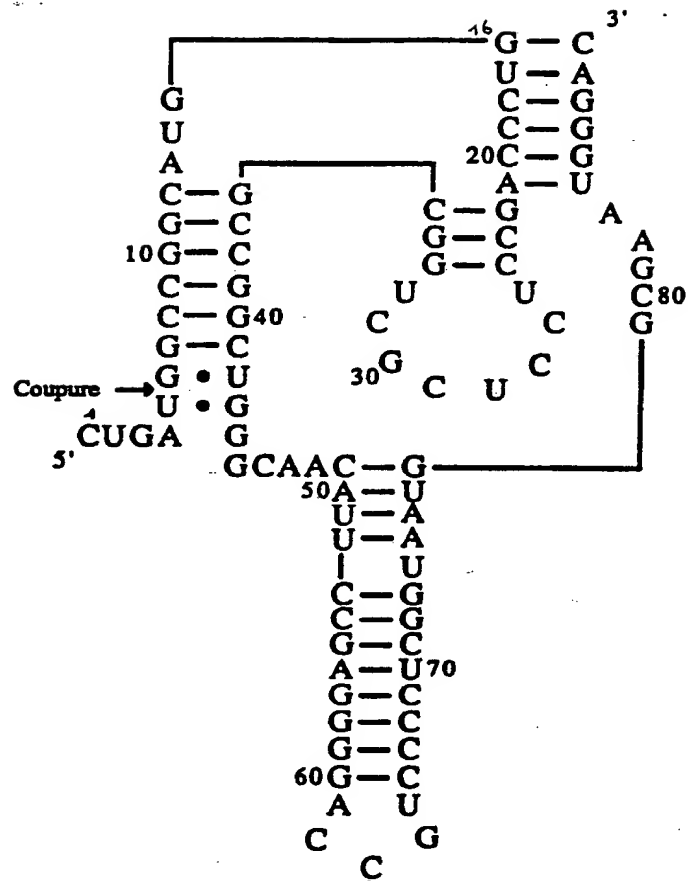
15

20

25

30

35



FIG_1

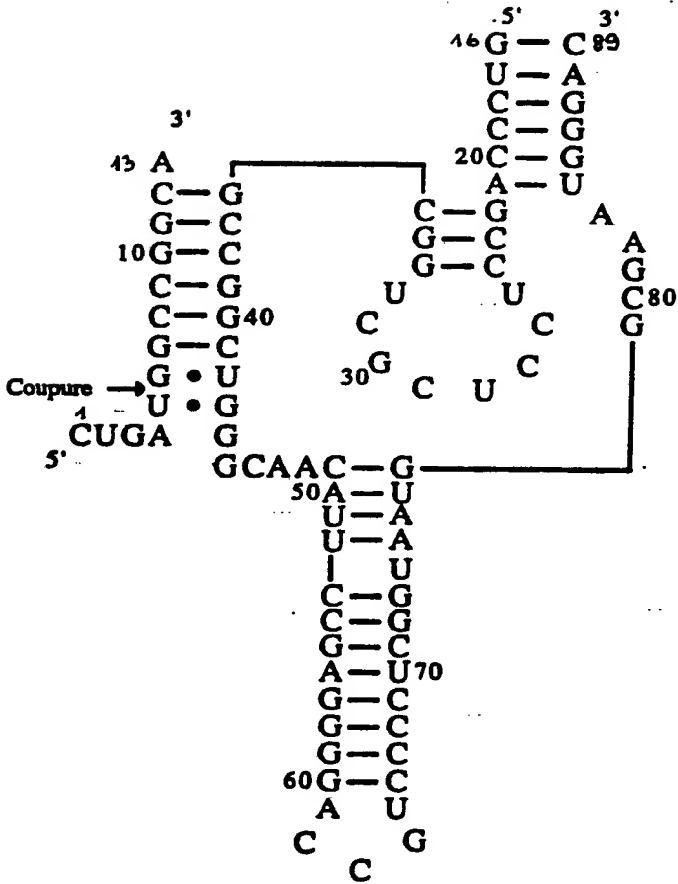
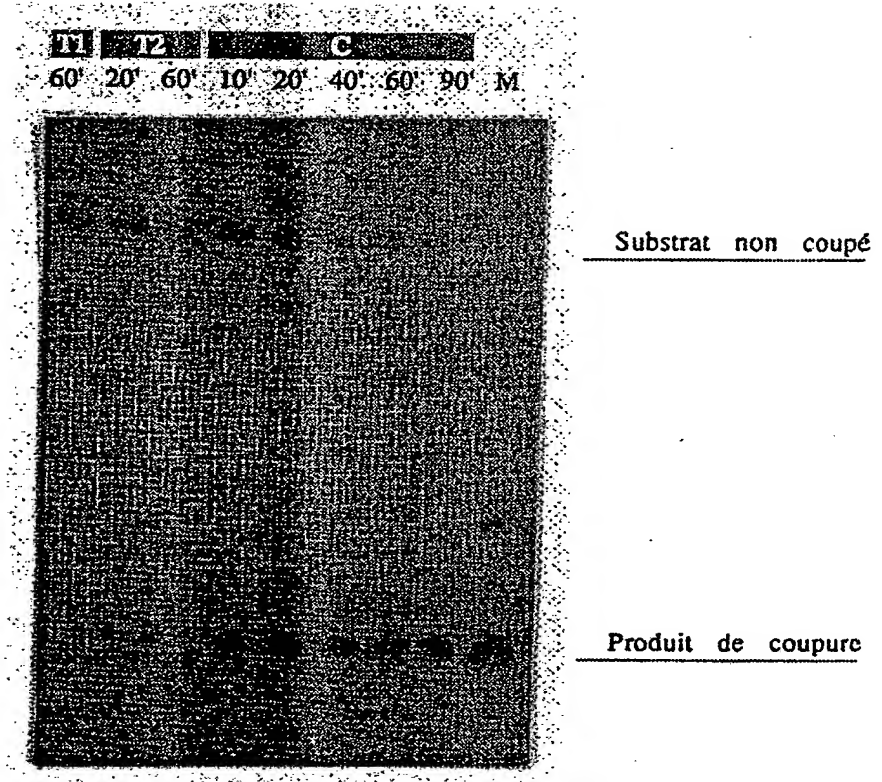
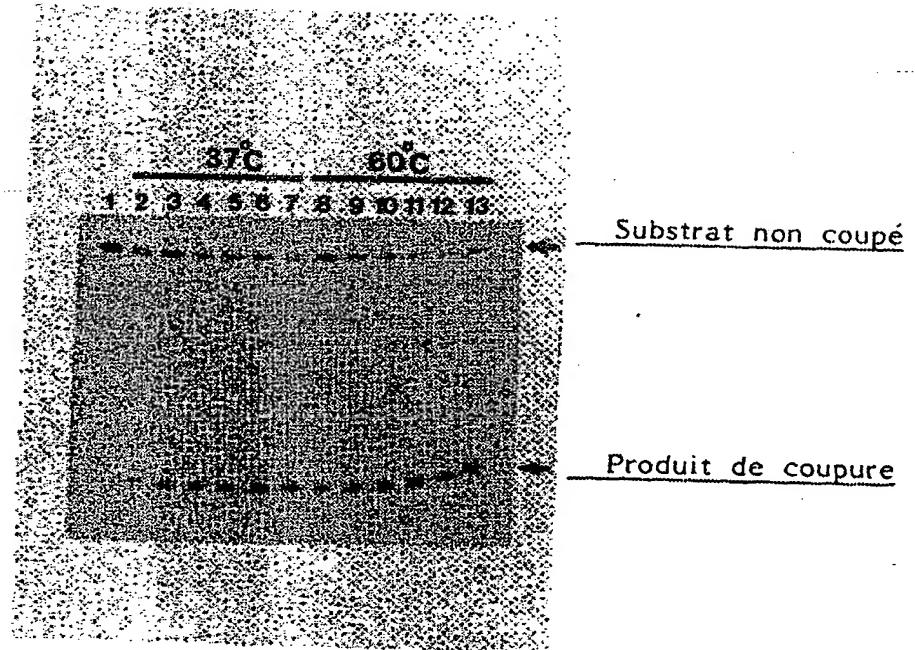


FIG. 2



FIG_3

FIG_4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Int. Cl.⁵ C12N15/51; A61K31/70; C12N9/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NATURE. vol. 350, 4 April 1991, LONDON GB pages 434 - 436 PERROTTA, A. & BEEB, M.D. 'A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA' * the whole document, and particularly figure 1 *</p>	1,5-8

☐ See patent family annex.

"&" document member of the same patent family

Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 18, No. 23, 11 December 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6821 - 6827 PERROTTA, A. & BEEN, M.D. 'The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effect of denaturants'	1,5-8
Y	* the whole document, and particularly figure 1B *	9-11
X	WO,A,9 104 324 (INNOVIR LABORATORIES, INC.) 4 April 1991	1,5-11
Y	see the whole document	9-11
X	WO,A,9 104 319 (INNOVIR LABORATORIES, INC.) 4 April 1991 see page 12, line 3 - page 14, line 16 see figure 3	1-2,5-11
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, No. 6, March 1989, WASHINGTON US pages 1831 - 1835 WU, H.-N. ET AL. 'Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity' see the whole document	1,5-10
X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 62, No. 12, December 1988, BALTIMORE, US pages 4439 - 4444 KUO, M.Y.-P. ET AL. 'Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus' see the whole document	1
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 19, No. 6, 25 March 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1285 - 1289 SMITH, J.B. & DINTER-GOTTLIEB, G. 'Antigenomic hepatitis delta virus ribozymes self-cleave in 18 M formamide' see the whole document	1

-./-

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 19, No. 23, 11 december 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6519 - 6525 THILL, G. ET AL. 'Self-cleavage of a 71 nucleotide-long ribozyme derived from hepatitis delta virus genomic RNA' see the whole document</p> <hr/>	1-11
P,X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 88, No. 22, 15 November 1991, WASHINGTON US pages 10163 - 10167 BRANCH, A.D. & ROBERTSON, H.D. 'Efficient trans cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent' see the whole document, in particular figure 1B and page 10165, right-hand column, second paragraph</p> <hr/>	1-2,4-8, 10-11

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200840
SA 64347**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 24/11/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9104324	04-04-91	AU-A- 6505990	18-04-91
		AU-A- 6511590	18-04-91
		EP-A- 0494228	15-07-92
		EP-A- 0494244	15-07-92
		WO-A- 9104319	04-04-91

WO-A-9104319	04-04-91	AU-A- 6505990	18-04-91
		AU-A- 6511590	18-04-91
		EP-A- 0494228	15-07-92
		EP-A- 0494244	15-07-92
		WO-A- 9104324	04-04-91

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/51; A61K31/70; C12N9/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C12N ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	<p>NATURE. vol. 350, 4 Avril 1991, LONDON GB pages 434 - 436 PERROTTA, A. & BEEN, M.D. 'A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA' * le document en entier, et spécialement la figure 1 *</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	1,5-8

^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
24 NOVEMBRE 1992	09. 12. 92
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé ANDRES S.M.

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 18, no. 23, 11 Décembre 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6821 - 6827 PERROTTA, A. & BEEN, M.D. 'The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effect of denaturants'	1,5-8
Y	* le document en entier, et spécialement la figure 1B *	9-11
X	WO,A,9 104 324 (INNOVIR LABORATORIES, INC.) 4 Avril 1991	1,5-11
Y	voir le document en entier	9-11
X	WO,A,9 104 319 (INNOVIR LABORATORIES, INC.) 4 Avril 1991 voir page 12, ligne 3 - page 14, ligne 16 voir figure 3	1-2,5-11
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, no. 6, Mars 1989, WASHINGTON US pages 1831 - 1835 WU, H.-N. ET AL. 'Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity' voir le document en entier	1,5-10
X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 62, no. 12, Décembre 1988, BALTIMORE, US pages 4439 - 4444 KUO, M.Y.-P. ET AL. 'Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus' voir le document en entier	1
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 19, no. 6, 25 Mars 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1285 - 1289 SMITH, J.B. & DINTER-GOTTLIEB, G. 'Antigenomic hepatitis delta virus ribozymes self-cleave in 18 M formamide' voir le document en entier	1

-/--

Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P,X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 19, no. 23, 11 Décembre 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6519 - 6525 THILL, G. ET AL. 'Self-cleavage of a 71 nucleotide-long ribozyme derived from hepatitis delta virus genomic RNA' voir le document en entier ---	1-11
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 88, no. 22, 15 Novembre 1991, . WASHINGTON US pages 10163 - 10167 BRANCH, A.D. & ROBERTSON, H.D. 'Efficient trans cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent' voir le document en entier, spécialement la figure 1B et page 10165, colonne de droite, le deuxième paragraphe -----	1-2,4-8, 10-11

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200840
SA 64347

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 24/11/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9104324	04-04-91	AU-A- 6505990	18-04-91
		AU-A- 6511590	18-04-91
		EP-A- 0494228	15-07-92
		EP-A- 0494244	15-07-92
		WO-A- 9104319	04-04-91

WO-A-9104319	04-04-91	AU-A- 6505990	18-04-91
		AU-A- 6511590	18-04-91
		EP-A- 0494228	15-07-92
		EP-A- 0494244	15-07-92
		WO-A- 9104324	04-04-91

EP FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82